

セリシンフィルムの物性に関する研究

その溶解性・分解性について

小林 哲 *

浅田 聡 *

セリシンを、ドラッグ・デリバリー・システム(注1)の素材用として、薬物を徐放する機能を持つ薬物担体やカプセルに応用することを目的としてセリシンフィルムを作成した。更に、作成したセリシンフィルムについて薬物徐放性能の制御法を評価する上で最も重要な課題である、溶解性・分解性について検討した。またセリシンフィルムを化学修飾し、その機能の変化について検討した。

1 はじめに

現在、セリシンは応用面でフィブロインにかなりの遅れをとってはいるものの、その優れた生体適合性や保湿性などの活用を目指した研究が積み重ねられている^{(1),(2),(3),(4)}。特にセリシンを構成するアミノ酸として、セリンがそのほぼ30%を占めており、セリン残基の反応性は注目に値するものである^{(5),(6)}。

フィブロインは長らく医療用素材として手術用縫合糸などに用いられ、更に現在ではフィブロインによる皮膚再生機能の促進作用が見出され、フィルム状にしたフィブロインの貼り薬への応用例などが報告されている^{(7),(8),(9),(10)}。また、セリシンについては医用素材への応用例はないものの、その抗酸化作用やチロシナーゼ阻害作用(注2)が見出されており^{(11),(12)}、潜在的な可能性を十分に有するものと考えられる。

本研究ではセリシンをドラッグ・デリバリー・システム(DDS)用の素材として、薬物担体やカプセルに応用することを目指し、その溶解性、酵素分解性などについて基礎的な性能の評価を行った。また、エチレングリコールジグリシジルエーテルとセリシンを架橋反応させて化学修飾したフィルムの、溶解性や分解性についても調べた。

2 材料

2.1 試料

生糸(平均繊維度:39.39 デニール、日本産繭)

2.2 試薬

メチルアルコール(和光純薬工業)、エチレングリコールジグリシジルエーテル(EGDE)(和光純薬工業)、クエン酸(和光純薬工業)、ホウ酸(片山化学工業)、水酸化ナトリウム(片山化学工業)、リン酸三ナトリウム12水和物(和光純薬工業)、トリプシン(和光純薬工業)

2.3 溶液

0.2M ホウ酸、0.05M クエン酸を含む水溶液に、0.1M リン酸三ナトリウム12水和物の水溶液を加え、各pHに調整し緩衝液を作成した。また、この緩衝液にトリプシンを添加した溶液を、セリシンフィルムの酵素分解性を評価する際に用いた⁽¹³⁾。

3 装置

高圧蒸気処理装置(RCS-60/10SR、日阪製作所製)、ロータリーエバポレーター(柴田科学製)、恒温恒湿器(IG-46M、ヤマト科学製)、フーリエ変換赤外分光光度計(FTIR-8200 PC、島津製作所製)、示差走査熱量計

* 技術課 技師

(DSC-6200, セイコー電子工業製)、紫外線分光光度計 (UV-2200, 島津製作所製)

4 方法

4.1 セリシンフィルムの作成

生糸の精練方法は120℃、60分の条件下、高温高压精練法で行い、セリシンを抽出した⁽⁴⁾。

抽出したセリシン水溶液は、ロータリーエバポレーターを用いて所定濃度に減圧濃縮した。所定濃度に調整したセリシン水溶液を、あらかじめテフロンシートを底面に貼り付けた直径 90 mm のポリプロピレン製のシャーレに流し込み、20℃、50 % R.H. の恒温恒湿器中で水平に静置し、3日間以上風乾することでほぼ均一な厚さのセリシンフィルムを得た。試料は20℃、65% R.H. の環境で保管し、フィルムの含水量がほぼ一定となったものを分析に供した。

また、EGDE と反応させる場合には、セリシン溶液を各濃度に減圧濃縮後、所定量のEDGEを加えた溶液を十分攪拌し、その後同様の環境下で風乾した。作成した修飾セリシンフィルムは20℃、65% R.H. の環境で保管し、含水量がほぼ一定となったものを分析に供した。

4.2 セリシンフィルムの分析

4.2.1 セリシンフィルムの赤外吸収特性の分析

IR スペクトルはフーリエ変換赤外分光光度計を用いて、KBr 法によって作成した分析用試料を、4,000 cm⁻¹ から 400 cm⁻¹ の範囲で測定した。

4.2.2 セリシンフィルムの熱分析

熱分析は、アロジン処理済アルミニウム製密封容器に、20℃、65% R.H. の環境で保管した試料 5mg を封入し、示差走査型熱量計を用いて昇温速度 2℃/min. で20℃から400℃の範囲で測定した。

4.2.3 セリシンフィルムの溶解性

作成したセリシンフィルムの約 20mg を、37℃の恒温槽中で、各pHの緩衝液 20ml に浸漬して静置した。紫外線吸光法により溶液の吸光度を 275nm において測定し、

吸光度－セリシン濃度の検量線からセリシンの溶出量を推定し、次の式から溶解率を計算した。

$$\text{溶解率: } R_i (\%) = (W_i / W_0) \times 100$$

W_i : 溶出したセリシンの量 (mg)

W_0 : 浸漬前のセリシンフィルムの重量 (mg)

4.2.4 セリシンフィルムの酵素分解性

タンパク質分解酵素のトリプシンを pH7 の緩衝液に溶解し、トリプシンの濃度を 0.01wt% とした。セリシンフィルム 20mg を、37℃の恒温槽中で、トリプシン溶液 20ml に浸漬し静置した。溶液は毎日交換し、溶液の吸光度を 275nm で測定した。そして吸光度－セリシン濃度の検量線からセリシンの緩衝液への溶出量を推定し、次の式から酵素分解率を計算した。

$$\text{分解率: } R_i (\%) = (W_i / W_0) \times 100$$

W_i : 溶出したセリシンの量 (mg)

W_0 : 浸漬前のセリシンフィルムの重量 (mg)

5 結果と考察

高温高压精練法によって抽出した1%セリシン溶液を減圧濃縮して各濃度に調整した後に乾燥し、各種フィルムを得た。2% のセリシン水溶液 100ml を乾燥して得られたフィルムについて、その厚さを20℃、65% R.H. の環境下で測定したところ、0.140 ± 0.009 mm (n=20) だった。また乾燥前にセリシン濃度が高いものほど、乾燥後のフィルムは淡い褐色を帯びていた。

また、各濃度から作成したフィルムの分解温度、IR スペクトルはともに、凍結乾燥法によって乾燥したセリシンの分解温度、IR スペクトルとほぼ一致していることが認められた。

DDS 用材料として応用する場合、長時間にわたる薬物放出性能と薬物放出後にそれが生体内で吸収され、代謝されることが望まれる。そこでこれらに大きく影響を及ぼす溶解性と酵素分解性について検討した。

図 1 はpHによるセリシンフィルムの溶解性の経時的な変化を表している。いずれの場合においても各pHでフィルムは部分的に溶解し、ほぼ 10 日後に溶出した

セリシンの濃度は一定になった。また、セリシンの溶出によってフィルムの脆弱化が認められたが、いずれも崩壊はしなかった。このことからセリシンの β 構造が発達して強固な網目構造を形成しているために、比較的加水分解を受けにくくなっているものと推定される。

また、フィルムの溶解率の大きさは $\text{pH}10 > \text{pH}2 > \text{pH}7 > \text{pH}4$ の順に減少している。この結果はセリシンの溶解挙動に十分に一致しており、この結果からセリシンの等電点付近でフィルムの溶解率が最小となっているものと予想される。またこの傾向は、セリシンの分子鎖が酸あるいはアルカリによって加水分解されるためと考えられる。

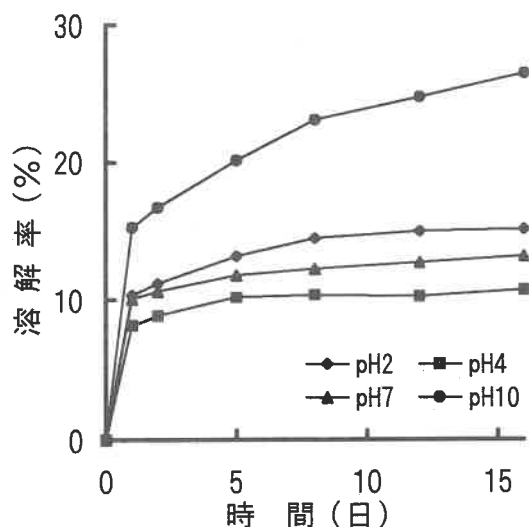


図1 溶液のpHによる2%セリシンフィルムの溶解性の経時変化。◆:pH 2、■:pH 4、▲:pH 7、●:pH 10、を表す(各試料とも $n>5$)。

EGDEはセリシンを構成しているアミノ酸残基である、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、そして $-\text{OH}$ のラジカルと容易に反応することによってセリシンの分子間を架橋し、 β 構造の形成が進行するものと考えられている⁹⁾。この反応を利用して作成したセリシン-EGDEフィルムは、柔軟性に富み乳白色を帯びた透明のフィルムであった。そこで、このフィルムについて次のような実験を行った。

図2は5.0%のEGDEを2.0%のセリシン水溶液と反応させて作成したセリシン-EGDEフィルムのIRスペ

クトルである。反応後のIRスペクトルにおいてアミド

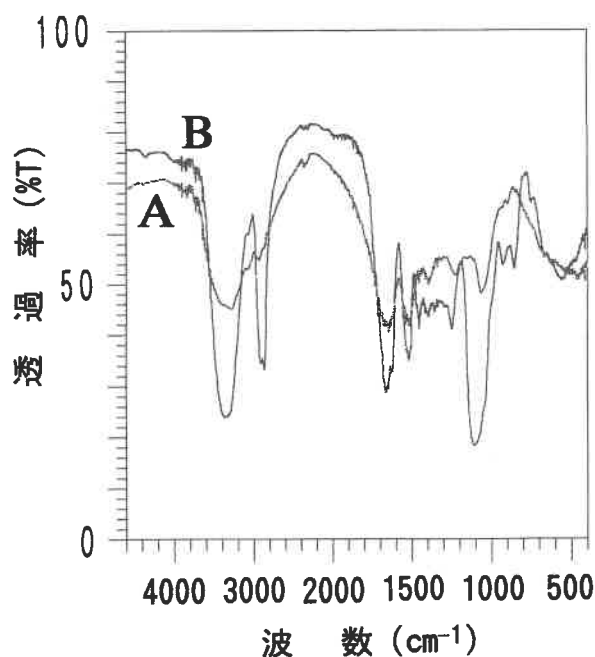


図2 対照とセリシン-EGDEフィルムのIRスペクトル。A:2.0% Sericin film、B:2.0% Sericin - 5.0% EGDE film

IとアミドIIの吸収帯が、 1652cm^{-1} と 1543cm^{-1} から 1629cm^{-1} と 1527cm^{-1} にシフトしている。更に非平行な β 構造の吸収帯が 1698cm^{-1} に現れており、架橋構造の存在を示唆している。

この結果からEGDEによる架橋反応によって、主にセリシンがランダムコイルから β 構造に変化したことを示しているものと考えられる。

更にセリシンの分子間をEGDEによって架橋反応させることによって、フィルムの溶解性がどのような影響を受けるかを調べた。

図3は2%セリシンフィルムと、2%セリシン-5%EGDEフィルムのDSCを比較したものである。吸熱反応のピークは 199°C から 246°C にシフトしている。この結果は、EGDEをセリシンと反応させたことで分子の網目構造が発達したためであると考えられる。

図4は各濃度のEGDEを2%のセリシン水溶液と反応させた、セリシン-EGDEフィルムをpH7の緩衝液中に浸漬した時の、溶解率の経時変化を示している。EGDEを反応させることによって、フィルムの溶解性が有為に減少していることが分かる。更に、EGDE濃

度が1.25 % の試料は、EGDE 濃度が 2.5 %・5.0 % の試料と比較して有為に溶解率が高かった。

このことは EGDE の濃度を増やすことによって、セリシンの分子間の架橋構造がより発達し、それに伴って β 構造が増加し安定化する。その結果として、溶解率が減少しているものと考えられる⁽¹⁵⁾。

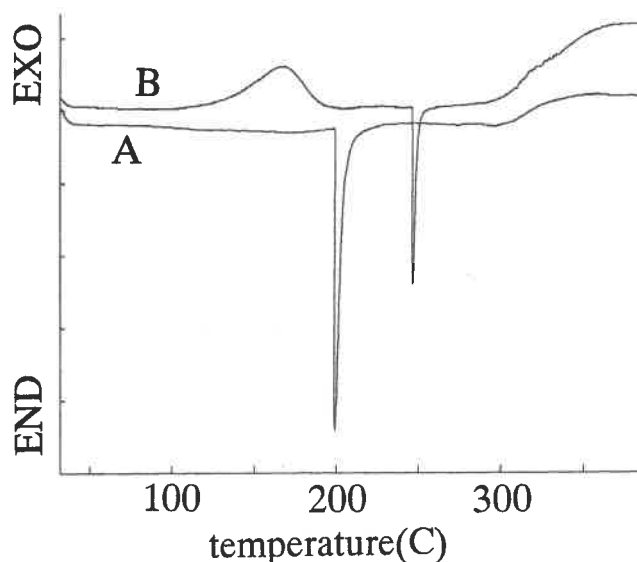


図3 対照とセリシン-EGDE フィルムのDSC。A:2.0% Sericin film、B:2.0% Sericin-5.0% EGDE film

次にタンパク質分解酵素のひとつであるトリプシンを用いて、セリシン-EGDE フィルムの分解率の経時変化について調べた。トリプシンは、腸内で主として食物タンパク質の消化に作用する酵素として広く知られている。

図5に、pH7の緩衝液中での溶解率と、緩衝液にトリプシンを添加した場合の溶解率とを比較した結果を示す。48時間後の緩衝液へのセリシンフィルムの溶解率は、対照の約1.3倍となった。また、同様に異なる pH における溶解率に関しても同様の比較を行ったところ、図に見られる結果と同様の傾向を示した。

EGDE を反応させることによって β 構造と架橋構造が発達する可能性が示唆されている。この結果ではセリシン-EGDE フィルムの分解率が、S.Min らの報告しているフィブロイン-EGDE フィルムの分解率よりも

かなり大きい⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。この結果、セリシン-EGDE フィルムのほうがフィブロイン-EGDE フィルムよりも結晶化が進行していないため、酵素分解反応を受け易くなっているものと推測される。また、トリプシンがアルギニンやリシンのカルボニル基側のペプチド結合を切断することが知られているが、セリシンとフィブロ

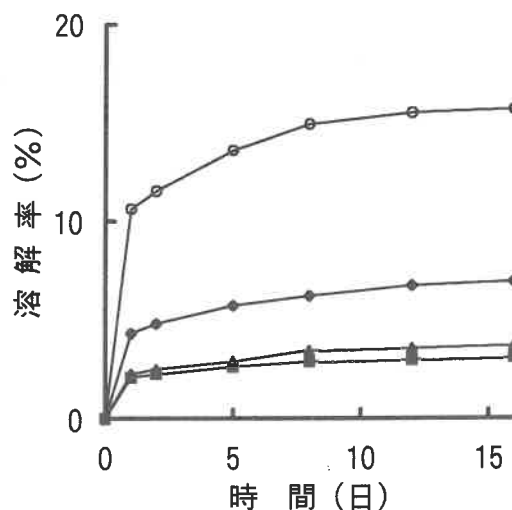


図4 EGDEの濃度によるフィルムの溶解性の経時変化。
○:対照、◆:1.25 %、▲:2.50 %、■:5.00 %、はEGDEの濃度を表している(各試料とも n=5)。

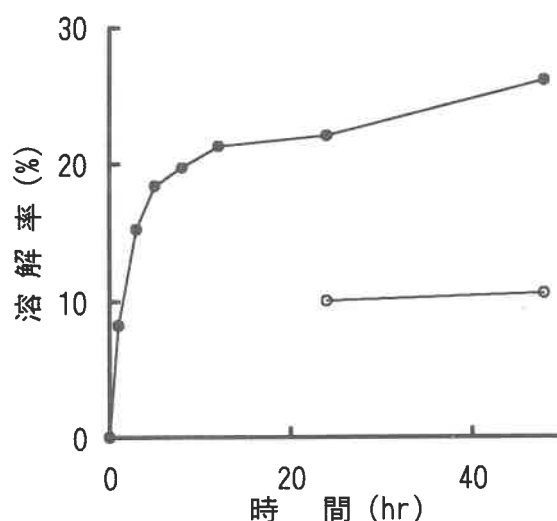


図5 トリプシンによるフィルムの溶解性の経時変化。
●:2.0% Sericin film、○:2.0% Sericin-5.0% EGDE film(各試料とも n>5)

インを構成するアミノ酸の割合を比較してみると、セリシンはトリプシンによる分解反応を受ける部位が比

較的多く存在し、その結果としてセリシン-EGDE フィルムの分解率が相対的に高くなっているものと推測される。これらの結果から、セリシン-EGDE フィルムはトリプシンのようなプロテアーゼによって分解されるが、EGDE の濃度を变化させることによって、その酵素分解性を制御できる可能性が考えられる。

6 総括

本研究において作成したセリシンフィルムは、薬物徐放性のカプセル用基剤としての可能性が期待できる。ここでは溶解性や分解性を中心に述べてきたが、今後徐放性やイオン透過性を評価するファクターを明らかにする必要がある。

EGDE とセリシンを反応させることによって、セリシンフィルムの溶解性や分解性が大きく変化することから、EGDE の濃度を变化させることによって薬物徐放性能、更に酵素分解性やある程度の強度が制御可能であると考えられる。

セリシンフィルムの利用法として、例えばカプセル状にフィルムを整形し、その中に薬物を封入することによって長期にわたる徐放性を備えたカプセル剤などが考えられる。また、フィルムの溶解性、安定性を制御することによって、生体適合性プラスチックとしての可能性も考えられる。しかしながら生体に用いる物質として、その物性のみならず安全性についても更なる検討が必要である。

7 参考文献

- (1) N.Kato: *Bioindustry*, **15**, 15 (1998)
- (2) R.Voegeli, *et al.*: *Cosmetics & Toiletries*, **108**, 101 (1993)
- (3) N.Yui, *et al.*: *Seitai Zairyou*, **10**, 218 (1992)
- (4) B.Thu, *et al.*: *Biomaterials*, **17**, 1031 (1996)
- (5) K.Komatsu: *J. Sericuet. Sci. Jpn.*, **49**, 457 (1980)
- (6) Y.Kamiishi, *et al.*: *J. Sericuet. Sci. Jpn.*, **64**, 323 (1995)
- (7) T.Hanawa, *et al.*: *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 284 (1995)
- (8) M.Tsukada, *et al.*: *J. Appl. Poly. Sci.*, **54**, 507 (1994)
- (9) 坪内紘三ら: 特願平9-333560
- (10) J.Chen, *et al.*: *Polymer*, **35**, 2853 (1994)
- (11) A.C.Tsai: *J. Nutr.*, **105**, 946 (1975)

- (12) T.Nagatsu, *et al.*: *Experimentia*, **28**, 634 (1972)

- (13) D.D.Perrin, *et al.*: *Buffers for pH and Metalon Control*, 155 (1994)

- (14) 浜岡容子ら: 平成 8 年度技術開発研究補助事業成果普及講習会用テキスト, **III** (1997)

- (15) S.Min, *et al.*: *Sen'i Gakkaishi*, **54**, 85 (1998)

- (16) S.Min, *et al.*: *Sen'i Gakkaishi*, **54**, 270 (1998)

8 注釈

(注 1) ドラッグ デリバリー システム(DDS)

ドラッグ デリバリー システムとは生体に対する薬物投与の最適化、すなわち投与形態を工夫することにより標的部位に必要時間にわたって必要量の主薬を送る届けることを究極の目的とする剤形の総称である。

(注 2) チロシナーゼ阻害作用

チロシナーゼはメラニン色素の生合成に関与する酵素のひとつである。チロシナーゼ阻害剤は、メラニンの生合成を抑制することによって皮膚の美白効果をもたらすことから、化粧品素材として有用である。また、チロシナーゼは食品の酵素的褐変反応にも関与しており、チロシナーゼ阻害剤は食品の変色防止にも有効である。